

## Muestreo de microzooplancton profundo (> 2000 m)

González-Gordillo, J. I.; Sánchez, R.

*CACYTMAR, Universidad de Cádiz*

### Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para obtener muestras microzooplancton (20 – 200  $\mu\text{m}$ ) profundo en una estación de muestreo determinada, para estudios cualitativos o cuantitativos.

Aunque el microzooplancton es muy abundante en aguas poco profundas de casi cualquier zona geográfica (ver Gifford y Caron, 2000) y no se necesita filtrar grandes volúmenes de agua para obtener una muestra representativa, no es así en aguas profundas (> 1000 m), donde probablemente pocos litros de agua pueden no ser suficientes para conseguir buenas estimas. Se hace pues necesaria la utilización de un muestreador que consiga filtrar un elevado volumen de agua por una malla de 20  $\mu\text{m}$ .

### Conceptos generales

El microzooplancton marino (20 – 200  $\mu\text{m}$ ) corresponde a un importante y numeroso grupo de organismos que incluyen tanto a protistas heterótrofos (principalmente ciliados y dinoflagelados) como a pequeños metazoos (generalmente larvas de invertebrados). La importancia ecológica de este grupo radica en que son importantes consumidores de bacterias y protistas autótrofos, constituyendo uno de los eslabones tróficos entre el bucle microbiano y la clásica red trófica de los metazoos. Así, para el estudio de los procesos de los que forman parte son necesarias estimas fiables de su abundancia y biomasa.

## Equipamiento necesario

Actualmente existen tres formas de obtener muestras de plancton de un intervalo de profundidad determinado: las redes de plancton con sistemas de apertura y cierre controlados, las botellas oceanográficas y sistemas de succión combinados con redes de plancton. Cada una de estas técnicas es elegida en base al tamaño de los organismos que desean estudiarse y su abundancia en el medio.

El uso de las redes de plancton está orientado al muestreo de organismos pertenecientes a las fracciones de tamaño superiores ( $> 200 \mu\text{m}$ ), para las cuales es necesario filtrar grandes volúmenes de agua para obtener muestras representativas. Para la recogida de muestras a determinadas profundidades, las redes más simples incluyen sistemas de apertura y cierre accionados mediante mensajeros. Sin embargo, con este tipo de sistema es difícil conocer con precisión la profundidad a la que se cierra la red, pues el cable que la remolca describe con frecuencia una línea curva durante la tracción, complicando los cálculos para estimar la profundidad real del equipo. Otras redes de plancton, como la *MultiPlankton Sampler* o la *Longhurst-Hardy Plankton Recorder*, utilizan sistemas automatizados para la apertura y cierre de las redes, incluyendo sensores de profundidad, con lo que se asegura la recogida de muestras de plancton a una profundidad concreta. Pero este tipo de equipos implica un diseño robusto, voluminoso y pesado de los equipos, que hacen que su manejo dependa del uso de una embarcación provista de plumas o pórticos ad hoc y de personal especializado en maniobras de cubierta.

Por otro lado, el muestreo de organismos pertenecientes a las fracciones de tamaño inferiores a las  $200 \mu\text{m}$  con redes de plancton es poco frecuente, pues los elevados tamaños de las aberturas de entrada de las redes y/o las velocidades de arrastre desarrolladas por las embarcaciones usadas provocan una rápida colmatación de las redes dando lugar a muestras inservibles. Sea cual fuere el caso, la propia metodología de muestreo implica que la red deba llevarse hasta la profundidad de muestreo y posteriormente subirla a bordo. Cuando la profundidad de estudio es elevada, superior a los 1000 m, los tiempos de largado y virado de las redes de plancton pueden abarcar varias horas, mientras que el tiempo verdaderamente efectivo de toma de muestras implica escasos minutos.

En consecuencia, las redes de plancton existentes actualmente no son viables para la recogida de organismos planctónicos pertenecientes a las fracciones pequeñas ( $< 200 \mu\text{m}$ ) a altas profundidades, pues su manejo supone un elevado coste en términos de infraestructura material, humana y tiempos de ejecución.

Una alternativa al uso de las redes de plancton podría ser la utilización de botellas oceanográficas tipo Niskin. El uso de estas botellas, cuando van encastradas en rosetas oceanográficas, reducen a cero los tiempos de ma-

niobra y el personal adicional implicado, pues las muestras dirigidas a estudios planctónicos se recogen al mismo tiempo que se realizan otras tareas como perfiles para mediciones de variables físico-químicas y recogida de muestras de agua para medida de otras variables biológicas. No obstante, llevando a cabo este tipo de muestreo, el volumen de agua filtrada podría ser insuficiente, principalmente porque las botellas oceanográficas generalmente usadas tienen una capacidad de 12 l. Este problema se acentúa cuando se muestrea en zonas oligotróficas en donde se requiere un mayor volumen de muestreo. Así, las muestras obtenidas por estos métodos pueden no ser representativas debido al escaso volumen filtrado.

Por último, existen mecanismos que combinan un sistema de succión de agua y redes de plancton que filtran ese volumen de agua impulsado. Este ingenio asegura el filtrado de un volumen de agua suficiente para que la muestra sea representativa de la comunidad planctónica a estudio y, además, al trabajar de forma estacionaria, se puede precisar la profundidad de muestreo. Un sistema de apertura y cierre mecánico accionado por mensajeros podría impedir la contaminación de las muestras por organismos de otras profundidades. El principal problema es que muestreos a profundidades mayores a una centena de metros sería casi inviable pues sería necesaria la utilización de mangueras de succión enormemente largas.

Debido, por tanto, a la falta de un muestreador adecuado para el muestreo de microzooplancton profundo se ha diseñado para tal fin en el seno del Proyecto Malaspina un equipo denominado *Bottle-net* y que mejora las características de los citados anteriormente en volumen muestreado, consumo de tiempo, coste y dificultad de manejo (información más completa en [www.sondara.com](http://www.sondara.com)).

La *Bottle-net* (Figura 1) está optimizada para trabajar acoplado a una roseta de botellas oceanográficas, pero podría utilizarse también de forma autónoma si es fijado a un cable oceanográfico lastrado. El funcionamiento general del equipo se basa en la canalización y filtrado de un determinado volumen de agua mediante una pequeña red de plancton de 20  $\mu\text{m}$  de luz de malla insertada dentro de una estructura rígida (carcasa), provista a su vez de un colector terminal. Los mismos disparadores remotos que se utilizan para cerrar las botellas de agua se utilizan para cerrar este sistema a una profundidad determinada. Durante su utilización, el agua a muestrear entra por una abertura superior, atraviesa la red de plancton de un micraje específico y sale a través de unas ventanas y orificios de evacuación. Los organismos quedan retenidos por la red y van acumulándose en el colector terminal del que se extraen posteriormente.

Al tratarse de un procedimiento carente de automatismos, debe establecerse un flujo de agua constante que asegure la entrada de los organismos dentro de la red. Este flujo se consigue gracias al desplazamiento vertical del equipo (de abajo a arriba) a lo largo de la columna de agua. En el caso de utilizarse montado en una roseta oceanográfica es ésta la que al recorrer



Figura 1. Detalles de la *Bottle-net*.

un trayecto vertical durante su utilización asegura la entrada de agua en el aparato, entre unos límites de profundidad establecidos por el investigador.

En el caso de disponer de dos disparadores libres en la roseta oceanográfica, existe una versión de la *Bottle-net* que puede abrir la tapa de entrada y cerrarla utilizando ambos disparadores, ello permitiría el muestreo de un estrato de la columna de agua desde cualquier profundidad y no necesariamente desde la profundidad máxima del perfil, como sucedería con la versión de un solo disparador.

## Descripción de la técnica

### *Toma de muestras*

Las muestras son el resultado de la filtración de la columna de agua que entra por la boca de la botella, desde la máxima profundidad a la que baje la roseta hasta la profundidad de cierre (ésta siempre por encima de la profundidad máxima alcanzada).

Inicialmente la *Bottle-net* desciende abierta, gracias a uno de los cables tensores de la roseta oceanográfica que mantiene abierta la tapa superior de la botella. Al llegar a la profundidad máxima del perfil la roseta oceanográfica comienza el ascenso y, como consecuencia, comienza a entrar agua en la *Bottle-net* que va siendo filtrada. Al llegar a la profundidad superior de

muestreo elegida, la entrada de agua hacia la red es interrumpida mediante el cierre de la abertura superior por la tapa hermética. Este cierre se consigue mediante la liberación de un cable tensor que une la tapa superior de la *Bottle-net* y uno de los disparadores automáticos del mecanismo de cierre remoto que utiliza la roseta oceanográfica para cerrar las diferentes botellas de muestreo. En este momento, unos muelles colocados en la tapa superior del sistema actúan cerrando la carcasa. Así, la entrada de agua al equipo queda sellada, impidiéndose la entrada de agua y, por tanto, evitándose la contaminación de la muestra por otros organismos de capas superiores. Por último, la muestra es recogida de un colector situado en el extremo inferior de la botella donde se acumulan los organismos filtrados (Figura 2).

Durante el uso de este equipo debe tenerse en cuenta las siguientes recomendaciones:

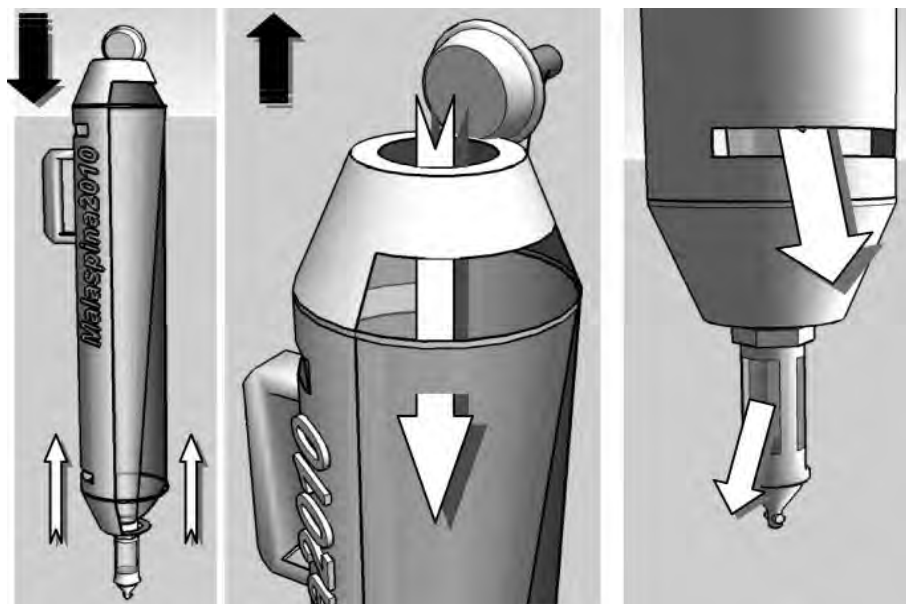


Figura 2. Esquema del funcionamiento de muestreador se indica a continuación. Las flechas negras indican el sentido de movimiento del equipo; las flechas blancas indican el sentido de movimiento del agua.

- Antes del inicio del muestreo debe llenarse hasta rebosar el colector de la *Bottle-net* con agua filtrada por malla inferior a  $1\ \mu\text{m}$ . Esto evita que los posibles organismos de superficie que puedan entrar al introducir el equipo en el agua se depositen en el fondo del colector y no puedan ser lavados durante la bajada de la roseta. En el caso de la versión de dos disparadores esta recomendación no sería necesaria.

- La roseta oceanográfica que porta la *Bottle-net* no debe pararse ni durante el descenso ni durante el ascenso, hasta que se llega a la profundidad de cierre de la *Bottle-net*, es decir, la roseta debe descender de forma continua hasta la profundidad máxima del perfil y seguidamente iniciar la subida también sin paradas. Si sucedieran paradas durante la bajada podría entrar agua de estratos superiores y contaminar la muestra. Si las paradas sucedieran durante el ascenso las redes podrían perder parte de la muestra por lavado.
- Antes de cualquier muestreo deberían hacerse pruebas para tener noción de la densidad de organismos existente en el estrato a muestrear. Un filtrado de gran cantidad de agua en un estrato de alta densidad de organismos supondrá la rápida colmatación de la red y la inutilidad de la muestra.
- Para la extracción de la muestra se recomienda no lavar la red con agua a presión pues seguramente esto provocaría la rotura de numerosos organismos de gran fragilidad. Debido a esto solo se recogerán los organismos que fluyan fácilmente a través del tapón del colector.
- Tras el muestreo, la red debe lavarse concienzudamente con agua filtrada tras cada muestreo, recomendándose sumergirla en lejía diluida cada 4 muestreos, con la idea de eliminar restos orgánicos que pudieran atascar la malla.

### *Conservación de muestras*

Dependiendo de la finalidad de las muestras el tratamiento de estas se realizará de distinta forma. No obstante, debe considerarse que los organismos del microzooplankton son muy frágiles y pueden romperse con facilidad, lo que dificultaría su estudio. A continuación se detalla el método de conservación para muestras que serán procesadas para análisis metagenómico y muestras para fines taxonómicos.

**Muestra para metagenómica:** Para la recogida de la muestra se extrae el tapón del colector y el contenido se vierte directamente en un sistema kitasato-vaso de filtración provisto de un filtro GF/F. Si la filtración es muy lenta se le puede aplicar ayudar succionando de forma muy suave con un pipeteador o bomba de mano. Los organismos quedarán retenidos en el filtro de fibra de vidrio. No utilizar una bomba de vacío pues podrían romperse los organismos y perderse su ADN. Posteriormente se extrae el filtro y se coloca enrollado en un tubo de plástico de polipropileno de 5ml al que se le añade etanol absoluto hasta cubrirlo totalmente. Durante todo el proceso debe tenerse especial cuidado de no contaminar la muestra con ADN extraño (restos de otros organismos, etc.). Se recomienda sellar el tubo con parafilm.

**Muestras para Taxonomía:** la mayoría de los organismos capturados serán ciliados por lo que se recomienda utilizar lugol para su conservación.

Preparar un frasco de vidrio color topacio de volumen adecuado con Lugol ya añadido; la concentración final de la muestra debe tener un contenido mínimo de lugol del 2%. Verter el contenido del colector de la *Bottle-net* directamente al frasco topacio, añadiéndosele, en caso necesario, agua de mar filtrada ( $< 5 \mu\text{m}$ ). No limpiar la red ni el colector con pulverizadores, para evitar al máximo la rotura de organismos.

El lugol es una solución que se degrada rápidamente con la luz, por tanto debe guardarse en oscuridad y en un envase de color topacio. También los frascos deben ser de vidrio pues el lugol se adhiere a las paredes plásticas disminuyendo su concentración en la solución conservante.

### *Estadillo de datos*

Se recomienda un modelo de estadillo que contenga los siguientes campos:

Volumen *Bottle-net*, Nº cast roseta, Hora inicio roseta, Hora fin roseta, Prof max Perfil, Hora inicio filtrado, Prof. Inicio Filtrado, Hora fin filtrado, Prof. Fin filtrado, Prof DCM, Prof. del Min.  $\text{O}_2$ , Prof DSL, Temperatura, Salinidad, Observaciones del muestreo.

### *Etiquetado*

No escribir directamente sobre el frasco, se borra con los conservantes o por el propio manejo. Etiquetar siempre sobre etiquetas adhesivas. Cada etiqueta debe ser cubierta por cinta de precinto transparente suficientemente ancha como para cubrir sobradamente la etiqueta. Verificar los datos de la etiqueta con los datos del muestreo y estadillo.

### **Calibración**

Debe evitarse que sucedan casos de colmatación de la red o de retroceso del agua a filtrar, debidos a una elevada abundancia de organismos filtrados o a una rápida velocidad de izado de la botella oceanográfica. Ambas circunstancias podrían evitarse realizando muestreos preliminares. Durante el muestreo la roseta no debe pararse pues podrían salirse los organismos capturados, el muestreo debe realizarse sin pausas.

### **Cálculo de resultados**

El cálculo del volumen de agua filtrada se estima resolviendo la siguiente ecuación:

$$Vol = (h_i - h_f) \times \pi r^2$$

siendo la profundidad de inicio del muestreo (máxima profundidad alcanzada), la profundidad final (profundidad de cierre de la red) y el radio de la abertura de entrada.

### Control de calidad

Aunque organismos superiores a 200  $\mu\text{m}$  pueden ser recogidos mediante esta técnica, estos no deberían usarse para estudios cuantitativos, pues su número podría estar subestimado debido al pequeño diámetro de boca de entrada del muestreador y a la alta capacidad de evasión de los organismos superiores a este tamaño.

### Referencias

GIFFORD, D. J.; D. A. CARON. 2000. «Sampling, preservation, enumeration and biomass of marine protozooplankton, Cap. 5: 193-221». En: HARRIS, R. P.; WIEBE, P. H.; LENZ, J.; SKJOLDAL, H. R.; HUNTLEY, M. (eds.). *ICES Zooplankton Methodology Manual*. Academic Press, 684 pp.